



A4

# SYSTEME ECHANTILLONNEUR AUTOMATIQUE D'UN LIQUIDE BIOLOGIQUE A PRELEVEMENT STERILE

**Patent number:** FR2647213  
**Publication date:** 1990-11-23  
**Inventor:** MARC IVAN; BLANCHARD FABRICE; RONAT EVELYNE; RABAUD JEAN-NOEL  
**Applicant:** CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)  
**Classification:**  
 - international: G01N1/10; G01N33/48  
 - european: C12M1/26; G01N1/14; G01N1/28A  
**Application number:** FR19890006647 19890522  
**Priority number(s):** FR19890006647 19890522

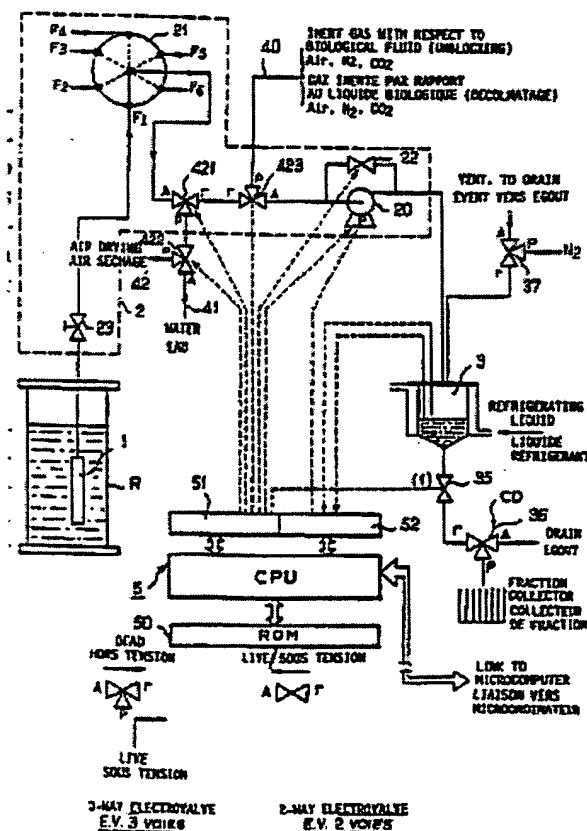
Also published as:

 WO9014586 (A1)  
 EP0473676 (A1)

Report a data error here

## Abstract of FR2647213

The invention relates to a system of automatic sterile sampling of a biological fluid. A filter module (1) is placed at the end of the sampling module (2) in the reactor (R). The sampling vessel (3) is directly connected to the outlet of the sampling module (2). A fluid injection circuit (40, 41, 42) is provided for controlling the sampling circuits which consist of the filter module (1), the sampling module (2) and the sampling vessel (3), said injection circuit being sequentially controlled by a control and calculation computer (5). Applications in laboratory or industrial sampling systems.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

## BEST AVAILABLE COPY



①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 647 213**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **89 06647**

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : G 01 N 1/10, 33/48.

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 22 mai 1989.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 47 du 23 novembre 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RE-  
CHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS).* — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Ivan Marc ; Fabrice Blanchard ; Evelyne  
Ronat ; Jean-Noël Rabaud.

⑦3 Titulaire(s) :

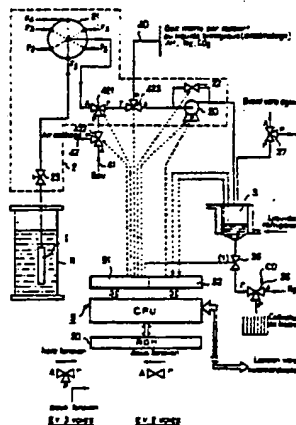
⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Martin, Schrimpf,  
Warcoï et Ahner.

⑤4 Système échantillonneur automatique d'un liquide biologique à prélèvement stérile.

⑤7 L'invention est relative à un système échantillonneur d'un  
liquide biologique à prélèvement stérile.

Un module de filtration 1 est placé en extrémité du module  
de prélèvement 2 dans le réacteur R. Le pot d'échantillonnage  
3 est directement connecté en sortie du module de prélève-  
ment 2. Un circuit 40, 41, 42 d'injection de fluides de contrôle  
des circuits de prélèvement constitués par le module de  
filtration 1, le module de prélèvement 2, le pot d'échantillon-  
nage 3 est prévu, ce circuit d'injection étant commandé sé-  
quentiellement par un calculateur 5 de contrôle et calcul.

Application aux systèmes échantillonneurs de laboratoires ou  
industriels.



FR 2 647 213 - A1

La présente invention est relative à un système échantillonneur automatique d'un liquide biologique à prélèvement stérile.

Le développement de nouveaux capteurs "in situ" utilisables en ligne dans les réacteurs biologiques, tels que les fermenteurs, est actuellement fortement limité par la nécessité de stériliser ces matériels.

De manière plus classique, seuls sont disponibles des capteurs de mesure physico-chimique de température, pression, potentiel Redox, pression partielle d'oxygène et CO<sub>2</sub> dissous ou de mesure de molécules gazeuses et volatiles dans les gaz ou à l'aide de membranes. La prise stérile d'échantillon liquide apparaît donc comme une solution au manque de capteurs "in situ", car dans ce cas, il est possible de coupler de nombreux analyseurs classiques pour la détection en ligne des molécules à quantifier.

A l'heure actuelle de nombreux auteurs ont proposé différents systèmes de prélèvement de milieu liquide biologique filtré, tels des milieux de fermentation, afin de pouvoir suivre ou contrôler l'évolution de procédés biotechnologiques.

Il est noté que la plupart de ces systèmes comportent un recyclage continu de milieu à filtrer. Le principe de ces systèmes consiste en un pompage continu du milieu biologique circulant dans une canalisation externe au réacteur avec, ensuite, réinjection dans le réacteur. Le prélèvement peut être séquentiel ou continu.

De tels systèmes ont fait l'objet notamment d'une description dans le brevet US 4 501 161 délivré le 26 février 1985. Le système décrit dans le brevet précité comprend deux membranes de diamètre moyen comprenant des pores variant entre 1 et 10  $\mu$ m et formant une boucle de recirculation externe avec prélèvement séquentiel.

Un autre système de ce type a fait l'objet d'une description dans l'article "An automatic and sterilizable sampler for laboratory Fermentors : Application to the on-line control of glucose concentration" publié par Mohamed Ghoul, Evelyne Ronat et Jean-Marc Engasser dans la revue Biotechnology and Bioengineering Vol. XXVII p. 119-121 (1986) John Wiley & Sons, Inc.

Le système décrit dans l'article précité met également en oeuvre une boucle de recirculation et une stérilisation à la vapeur des circuits de prélèvement jusqu'au module de filtration doit être prévue.

5 Plus récemment, un certain nombre de systèmes ont été proposés par différents constructeurs. Parmi ces derniers, un système à filtration au moyen d'un module céramique multicouche asymétrique a été décrit dans le document 86 1100459 "On Line Aseptic Autosampler" publié par la Société Komatsugawa Chemical Engineering Co., Ltd, 10-5, Iwamoto-cho 1- Chome, Chiyoda-ku, Tokyo Japon. Ce type d'appareil fait  
10 l'objet cependant d'une stérilisation à la vapeur.

Ainsi, les différents systèmes précédemment décrits sont, la plupart du temps, utilisables dans des conditions de travail limitées, fermentation de levures ou cellules vivantes de grande taille. Les problèmes le plus fréquemment rencontrés sont liés à la polarisation et au  
15 colmatage plus ou moins rapides selon le type de membrane de filtration utilisées, surtout dans le cas de filtrations frontales, à la durée de latence pour obtenir un échantillon représentatif dans le cas de filtrations tangentielles, à la taille des pores qui, trop importante, ne permet pas de travailler avec des bactéries, à la complexité des systèmes qui comprennent  
20 soit un grand nombre de pompes, soit des systèmes de stérilisation à vapeur complexes, au volume trop important de la boucle de recyclage par rapport au volume d'un petit réacteur ou fermenteur de laboratoire, de l'ordre de deux litres, ainsi qu'à la fiabilité de la prise stérile d'échantillon et donc au respect de la stérilité.

25 Le système échantillonneur automatique d'un liquide biologique à prélèvement stérile, objet de l'invention, a pour but de remédier à l'ensemble des inconvénients précités.

Un autre objet de la présente invention est la mise en oeuvre d'un système ne comportant pas de boucle de recirculation du liquide  
30 biologique soumis au prélèvement.

Un autre objet de la présente invention est la mise en oeuvre d'un système dans lequel les organes de stérilisation à la vapeur sont supprimés.

Un autre objet de la présente invention est également la mise en oeuvre d'un système permettant d'assurer le prélèvement d'échantillons dans des conditions de fiabilité et de stérilité satisfaisantes en l'absence d'une stérilisation effective des circuits correspondants au cours de  
5 prélèvements successifs.

Le système échantillonneur automatique d'un liquide biologique à prélèvement stérile, objet de l'invention, comprend un module de prélèvement dans un réacteur du liquide biologique, un module de filtration  
10 relié à un pot d'échantillonnage, un circuit de distribution du ou des échantillons vers des moyens analyseurs et des moyens de commande et de calcul interconnectés respectivement au module de prélèvement, au module de filtration, au pot d'échantillonnage et au circuit de distribution du ou des échantillons pour assurer une commande séquentielle de la prise d'échantillons.

15 Il est remarquable, d'une part, en ce que le module de filtration est placé en extrémité du module de prélèvement dans le réacteur, le pot d'échantillonnage étant directement connecté en sortie du module de prélèvement et, d'autre part, en ce qu'il comprend un circuit d'injection de fluides de contrôle des circuits de prélèvement constitués par  
20 le module de prélèvement, le pot d'échantillonnage, le circuit d'injection de fluides de contrôle étant commandé séquentiellement par le moyen de commande et de calcul.

Le système, objet de l'invention, sera décrit de manière plus détaillée en liaison avec les dessins ci-après dans lesquels :

25 . la figure 1 représente une vue générale du système échantillonneur automatique d'un liquide biologique à prélèvement stérile objet de l'invention,

30 . la figure 2 représente une vue en coupe selon un plan longitudinal de symétrie d'un pot d'échantillonnage permettant la réalisation du système selon l'invention, tel que représenté en figure 1,

. les figures 3 et 4 représentent en coupe selon un plan de

symétrie longitudinale respectivement d'un module de filtration et d'une cartouche ou manchon de filtration, conformément à l'objet de la présente invention,

5       . la figure 5 représente un organigramme simplifié permettant de réaliser une ou plusieurs prises d'échantillons séquentielles, conformément au système selon l'invention.

10       Les réactions métaboliques complexes mises en jeu chez les microorganismes (bactéries, levures, champignons, cellules végétales et animales) au cours des procédés de "fermentation" sont sensibles à de nombreux paramètres extérieurs, tels que pH, température, pression, ainsi qu'à l'âge ou l'état physiologique des cellules.

15       D'un point de vue industriel et pratique, il est indispensable de maîtriser l'évolution des procédés en agissant sur les paramètres physico-chimiques ou en contrôlant la composition du milieu de culture en certains de ses constituants essentiels. La maîtrise quantitative des procédés est un élément primordial dans l'obtention de hautes productivités ou de produits de qualité constante. A l'heure actuelle, le suivi des procédés est, dans la grande majorité des cas, réalisé à partir d'une prise d'échantillon hors ligne. Cet échantillon est composé d'une phase liquide et  
20       d'une phase solide comprenant les microorganismes et d'autres matériaux comme des débris cellulaires ou encore provenant de la matière première. L'analyse quantitative des composés biochimiques, substrats et produits du métabolisme, par les méthodes classiques de chromatographie en phase gazeuse ou liquide, par exemple, nécessite l'élimination des particules  
25       solides.

30       Le prélèvement hors ligne présente toutefois un certain nombre de problèmes et d'inconvénients comme le risque de contamination ou la non représentativité de l'échantillon due aux techniques d'échantillonnage et de séparation solides-liquide, en particulier dans le cas d'analyses de métabolites volatiles.

Par contre, un échantillonnage en ligne permet en principe de

mieux contrôler un procédé s'il répond à un certain nombre de critères. Le volume prélevé doit être faible, constant et représentatif de l'état du milieu de fermentation grâce à un système simple et fiable qui, par sa conception, minimise les pertes de manière à pouvoir être utilisé dans des réacteurs à contenance limitée (à partir de 2 litres). Tout en garantissant une filtration performante, rapide et répétitive à intervalles de temps réguliers mais variables, le dispositif doit assurer une stérilité absolue vis-à-vis du milieu de culture.

Le système échantillonneur automatique d'un liquide biologique à prélèvement stérile, objet de la présente invention, sera tout d'abord décrit en liaison avec la figure 1.

Selon la figure précitée, le système échantillonneur, objet de l'invention comprend un module de prélèvement 2 d'échantillons dans un réacteur R ou fermenteur du liquide biologique considéré. Il comprend également un module de filtration 1, le module de filtration 1 et le module de prélèvement 2 étant reliés à un pot d'échantillonnage 3. Un circuit de distribution CD du ou des échantillons prélevés vers des moyens analyseurs est également prévu. Le système échantillonneur, objet de l'invention, comporte en outre des moyens de commande et de calcul 5 interconnectés respectivement au module de prélèvement 2 et au module de filtration 1 au pot d'échantillonnage 3 et au circuit de distribution CD du ou des échantillons pour assurer une commande séquentielle de la prise d'échantillon précitée.

Selon une caractéristique particulièrement avantageuse du système, objet de l'invention, le module de filtration 1 est placé en extrémité du module de prélèvement 2 dans le réacteur R ou fermenteur. Le pot d'échantillonnage, conformément à un autre aspect particulièrement avantageux du système objet de l'invention, est alors directement connecté en sortie du module de prélèvement 2, en l'absence de boucle de recyclage du liquide biologique prélevé.

Ainsi qu'on l'a en outre représenté en figure 1, le système



échantillonneur comporte également un circuit 40, 41, 42 d'injection de fluides de contrôle des circuits de prélèvement constitués par le module de filtration 1, le module de prélèvement 2, le pot d'échantillonnage 3.

5 Selon un autre aspect particulièrement avantageux du système échantillonneur, objet de l'invention, ainsi qu'il sera décrit plus en détail ci-après dans la description, le circuit d'injection de fluides de contrôle est commandé séquentiellement par le moyen de contrôle et de calcul 5.

10 Afin de réaliser l'ensemble des différentes fonctions du système échantillonneur automatique d'un liquide biologique à prélèvement stérile, objet de la présente invention, le circuit d'injection de fluides de contrôle des circuits de prélèvement comporte avantageusement, ainsi qu'on l'a représenté en figure 1, un premier circuit 40 d'injection d'un gaz inerte au liquide biologique à prélever. Ce circuit permet avantageusement d'assurer un prédécolmatage et/ou un décolmatage du module de filtration 1 par injection du gaz inerte vers le réacteur ou fermenteur R.

15 Ainsi qu'on le comprendra, le gaz inerte par rapport au liquide biologique pour assurer les fonctions de prédécolmatage ou de décolmatage peut être constitué, en fonction de la nature du liquide biologique considéré à échantillonner, par de l'air, de l'azote, du gaz carbonique par exemple.

20 Ainsi qu'on l'a en outre représenté en figure 1, le circuit d'injection de fluides de contrôle des circuits de prélèvement comporte un deuxième circuit 41 d'injection d'une eau de rinçage des circuits assurant la liaison entre le réacteur ou fermenteur R et le pot d'échantillonnage 3.

25 De même, sur la figure 1 précitée, on a représenté un troisième circuit 42 d'injection d'air sec dans les circuits assurant la liaison entre le réacteur ou fermenteur R et le pot d'échantillonnage 3. Le circuit 42 précédemment mentionné est donc également l'un des éléments constitutifs du circuit d'injection de fluides de contrôle, conformément à 30 l'objet de la présente invention, ce circuit 42 permettant d'assurer un séchage des circuits assurant la liaison entre le réacteur R et le pot d'échantillonnage 3.

Un mode de réalisation avantageux des premier 40, deuxième 41 et troisième 42 circuits d'injection d'un gaz d'eau de rinçage et d'air sec inerte sera décrit en liaison avec la figure 1, ce mode de réalisation permettant d'assurer l'injection du gaz inerte précité de l'eau de rinçage et de l'air sec.

Ainsi qu'on l'a représenté sur la figure 1 précitée, les premier 40, deuxième 41 et troisième 42 circuits d'injection peuvent avantageusement être constitués par une première électrovanne 421 à trois voies interconnectée en liaison entre l'extrémité du module de prélèvement reliée au module de filtration 1 et le pot d'échantillonnage 3. Cette première électrovanne à trois voies 421 reçoit sur une entrée auxiliaire l'eau de rinçage ou l'air de séchage, ainsi qu'il sera décrit ci-après.

Afin d'assurer l'alimentation de l'entrée auxiliaire précitée de la première électrovanne à trois voies 421 en eau de rinçage ou en air de séchage, le deuxième circuit d'injection 41 peut, ainsi que représenté sur la figure 1, avantageusement être constitué par une deuxième électrovanne à trois voies 422 connectée en liaison entre le circuit d'amenée d'eau de rinçage et l'entrée auxiliaire de la première électrovanne 421 précédemment mentionnée. La deuxième électrovanne à trois voies 422 reçoit sur une entrée auxiliaire l'air de séchage destiné à assurer le séchage précité.

Enfin, ainsi que représenté en figure 1, une troisième électrovanne à trois voies 423 est prévue, cette troisième électrovanne étant connectée en liaison entre la première électrovanne 421, en sortie de celle-ci, et le pot d'échantillonnage 3. Une entrée auxiliaire de la troisième électrovanne 423 reçoit le gaz inerte au liquide biologique pour assurer la fonction de prédécolmatage ou de décolmatage précédemment citée. La troisième électrovanne 423 constitue ainsi l'entrée du premier circuit d'injection 40 précité. On notera que l'alimentation en gaz inerte par rapport au liquide biologique peut être effectuée à partir d'un réservoir de gaz inerte sous pression. Il en est de même, en ce qui concerne l'alimentation en air de séchage, de la deuxième électrovanne à trois voies

422. Bien entendu, cette électrovanne précédemment citée 422 est alimentée à partir d'un réservoir d'eau distillée, lequel distribue l'eau de rinçage précédemment mentionnée.

5 Afin d'assurer le prélèvement des échantillons de liquide biologique, d'une part, et les différentes fonctions de prédécolmatage, décolmatage, rinçage et séchage, ainsi qu'on l'a représenté en figure 1, les moyens de prélèvement 2 comportent en outre une pompe de type pompe péristaltique 20 assurant l'interconnexion entre la troisième électrovanne 423 et le pot d'échantillonnage 3. On notera que, de manière avantageuse, 10 la pompe péristaltique 20 est associée à une vanne ou électrovanne 22 montée en by-pass sur la pompe précitée. L'ouverture brutale de l'électrovanne 22 permet d'effectuer un décolmatage du module de filtration 1 en cours de prélèvement. En effet, cette ouverture provoque l'arrêt de l'aspiration en amont de la pompe 20, et donc un décollage des 15 particules qui se seraient agglomérées sur la couche ou membrane extérieure 113 du module de filtration

On notera enfin que la jonction entre l'élément de prélèvement 2 et le module de filtration 1 peut avantageusement être réalisée par l'intermédiaire d'une vanne manuelle 23. Cette vanne manuelle permet 20 d'assurer une fonction de sécurité afin d'isoler totalement, le cas échéant, le réacteur R, et le milieu biologique contenu dans ce dernier, de l'ensemble de l'installation.

Selon une autre caractéristique avantageuse du système, objet de l'invention, le pot d'échantillonnage 3 est un pot réfrigéré. Ainsi, le pot 25 d'échantillonnage 3 comporte une double paroi, dans laquelle est ménagé un courant de liquide réfrigérant permettant de maintenir l'échantillon de liquide biologique prélevé à une température prédéterminée en fonction de la nature du liquide biologique considéré. Le système de réfrigération du pot d'échantillonnage 3 ne sera pas décrit car il peut être réalisé par tout 30 moyen habituellement utilisé en laboratoire permettant des conditions de réfrigération compatibles avec l'obtention et le maintien du caractère de stérilité du ou des échantillons prélevés.

Une description plus détaillée d'un mode de réalisation avantageux d'un pot d'échantillonnage 3 sera donnée en liaison avec la figure 2.

5 La figure 2 précitée représente une vue en coupe selon un plan longitudinal de symétrie d'un pot d'échantillonnage 3 selon un mode de réalisation avantageux du système objet de l'invention.

Selon la figure précitée, le pot d'échantillonnage comprend un orifice 30 d'entrée d'échantillon, cet orifice 30 étant directement relié en sortie de la pompe péristaltique 20. L'orifice d'entrée d'échantillon 30 est  
10 lui-même relié à une chambre 31 d'admission d'échantillon, cette chambre d'admission étant munie d'un répartiteur 310. Un évent 311 est prévu, cet évent étant en communication avec la chambre d'admission 31 précitée. Le répartiteur 310 peut être constitué avantageusement par un élément conique de révolution muni de trous traversants parallèles à l'axe  
15 longitudinal du pot d'échantillonnage 3. Les trous traversants précités sont en communication avec une chambre de réception d'échantillon 32. La chambre de réception d'échantillon 32 est elle-même en communication avec un orifice de sortie d'échantillon 33, lequel est lui-même relié au circuit de distribution CD, ainsi qu'il sera décrit ultérieurement dans la  
20 description.

Ainsi qu'on l'a représenté en outre en figure 2, la chambre de réception 32 d'échantillon est munie d'une pluralité d'électrodes 320, 321, 322. Les électrodes précitées constituent des sondes de niveau de liquide biologique échantillonné. De façon non limitative, l'électrode 320 peut  
25 correspondre à un volume d'échantillons prélevés minimum, l'électrode 321 peut correspondre à un volume d'échantillons prélevés intermédiaire, et l'électrode 322 peut correspondre à un volume d'échantillons prélevés maximum.

Le corps du pot d'échantillonnage peut alors être réalisé en un  
30 matériau inerte au liquide biologique, tel que par exemple des plastiques alimentaires ou analogue.

Ainsi qu'on l'a représenté en outre en figure 1, l'orifice de sortie 35 du pot d'échantillonnage est connecté au circuit de distribution CD par l'intermédiaire d'une électrovanne à deux voies 35. Cette même électrovanne à deux voies 35 est elle-même interconnectée à une  
5 électrovanne à trois voies 36, dont une entrée est connectée à l'électrovanne à deux voies 35, une première sortie directe est connectée à une canalisation d'évacuation ou égout et une deuxième sortie commandée est reliée vers un tube de distribution ou vers un collecteur de fraction d'échantillon.

10 En outre, ainsi qu'on l'a représenté en figure 1, l'évent 311 sur la figure 2 est lui-même relié par l'intermédiaire d'une électrovanne à trois voies 37, d'une part, vers une canalisation d'évacuation ou égout en liaison directe et, d'autre part, en liaison commandée vers une source de pression d'un gaz inerte ou liquide biologique échantillonné.

15 Dans un mode de réalisation avantageux du système, objet de l'invention, tel que représenté en figure 1, la liaison entre la première électrovanne à trois voies 421 et l'extrémité du module de prélèvement relié au module de filtration 1 est effectuée par l'intermédiaire d'une vanne multivoies de sélection 21. Les entrées multiples de la vanne de  
20 sélection 21 peuvent être reliées séquentiellement à un réacteur différent déterminé, chaque réacteur pouvant contenir des solutions biologiques différentes ou des lots différents d'une même solution biologique. La sortie de la vanne multivoies de sélection 21 est directement connectée à la première électrovanne à trois voies 421.

25 Sur la figure 1, les électrovannes à deux voies et les électrovannes à trois voies ont été représentées de manière symbolique, les électrovannes à deux voies comportant une entrée d'admission A et une sortie de refoulement r, la mise sous tension de l'électrovanne provoquant l'admission par l'entrée A et le refoulement par la sortie r du fluide  
30 considéré. De même, les électrovannes à trois voies ont été représentées comme comportant une entrée d'admission A, une sortie de refoulement ou entrée r et une entrée auxiliaire P, l'absence de commande en tension de

l'électrovanne à trois voies considérée permettant la transmission d'un fluide entre l'entrée d'admission A et la sortie de refoulement r ou réciproquement, alors que la commande en tension de l'électrovanne à trois voies considérée a pour effet la transmission d'un fluide différent entre  
5 l'entrée auxiliaire P et la sortie de refoulement r. Le fonctionnement de l'ensemble du dispositif ou système objet de l'invention, tel que représenté en figure 1, sera décrit ultérieurement dans la description.

Une description plus détaillée du module de filtration 1 sera maintenant donnée en liaison avec la figure 3.

10 Conformément à la figure précitée, le module de filtration 1 comporte avantageusement un corps de filtre central 10 formant axe de montage d'un élément de filtration et un élément de filtration amovible 11 formé par un manchon en matériau céramique. L'élément de filtration amovible 11 est engagé sur l'axe de montage 10. La liaison entre les bords  
15 de section droite de l'élément de filtration 11 et les surfaces d'appui de l'axe de montage 10 est effectuée au moyen de joints d'étanchéité notés 100, 110 sur la figure 3. Les joints d'étanchéité peuvent avantageusement être constitués par des joints au silicone.

Selon un aspect particulièrement avantageux du système objet  
20 de l'invention, l'élément de filtration 11 est constitué par un manchon cylindrique 112, ainsi que représenté en figure 4, en coupe selon un plan de symétrie longitudinal du manchon. Ce manchon cylindrique 112 peut avantageusement être constitué en céramique de diamètre moyen de pores de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ . En outre, ainsi qu'on l'a représenté sur cette même  
25 figure 4, une couche interne 114 et une couche externe 113 en céramique greffée sont prévues sur les surfaces latérales interne et externe du manchon cylindrique précité. Les couches interne 114 et externe 113 greffée présentent un diamètre moyen de pores inférieur ou égal à 0,2  $\mu\text{m}$  et font office de membrane filtrante.

30 En outre, en vue de garantir une étanchéité absolue du montage, un émaillage ou dépôt d'une couche de résine époxy 115, 116 est prévue aux deux extrémités de l'élément de filtration 11. L'émaillage ou le

dépôt précité peut recouvrir les extrémités précitées sur une longueur de 1 cm environ. Les couches externe 113 et interne 114 sont constituées en alumine  $\alpha$  de diamètre moyen de pores compris entre 0,1 et 0,4  $\mu\text{m}$ , de préférence de 0,2  $\mu\text{m}$ , et le manchon cylindrique 112 en alumine  $\alpha$  d'un diamètre de pores de 10  $\mu\text{m}$  à 15  $\mu\text{m}$  environ. Le manchon cylindrique 112 et les couches interne 114 et externe 113 sont liés de façon monolithique par frittage.

Ainsi qu'on l'a en outre représenté en figure 3, l'axe de montage 10 comporte avantageusement une canalisation interne centrale 105 abouchant à la partie opposée de la partie distale de l'axe de montage 10 précité. La canalisation interne centrale 105 abouche ainsi à l'intérieur de l'élément de filtration 11 ou du manchon cylindrique 112 précité et constitue l'extrémité des moyens de prélèvement 2. Sur la figure 3, les orifices par lesquels le canal interne central 105 abouche dans le manchon 112 sont notés 1050 et 1051.

Une description plus détaillée des moyens de commande et de calcul 5 sera donnée en liaison avec les figures 1 et 5.

Ainsi qu'on l'a représenté en figure 1, les moyens 5 de commande et de calcul peuvent être constitués avantageusement par un microprocesseur CPU interconnecté à des circuits d'interface 51 et 52 et comportant en outre une mémoire de programme 50.

Les circuits d'interface précités comportent avantageusement une première série 51 de circuits d'interface de commande de prélèvement. Ces circuits d'interface de la première série 51 peuvent consister chacun en un circuit de conversion numérique analogique délivrant à chacune des électrovannes à trois voies précédemment décrites et à la pompe péristaltique 20 une tension de commande de marche ou d'arrêt par exemple.

De même, la deuxième série 52 de circuits d'interface de détection de niveau d'échantillon peut consister, pour chacun des interfaces, en un circuit de conversion analogique numérique délivrant au microprocesseur CPU des messages correspondants de niveau d'échantillon dans le pot d'échantillonnage 3.

La mémoire de programme 50 peut avantageusement être constituée par une mémoire morte ROM dans laquelle un programme de conduite séquentielle du prélèvement d'échantillon est implanté.

5 Ainsi qu'on l'a représenté en figure 5, le programme de conduite séquentielle du prélèvement d'échantillon peut comporter avantageusement un premier sous programme 1000 permettant d'assurer une phase de prédécolmatage de l'élément de filtration 1 par admission d'un gaz inerte vers le réacteur ou fermenteur R. Dans ce cas, la troisième électrovanne à trois voies est commandée en tension, électrovanne 423, et  
10 les première et deuxième électrovannes à trois voies sont au repos, électrovannes 421, 422.

Le premier sous programme 1000 est ensuite suivi d'un deuxième sous programme 1001 permettant de placer le système, objet de l'invention, en une phase d'attente pendant une durée de quelques secondes  
15 par exemple. Dans ce cas, aucun des éléments de prélèvement n'est excité.

Le deuxième sous programme 1000 précédemment mentionné est alors suivi d'un troisième sous programme 1002 permettant d'assurer une phase de prélèvement proprement dite. Dans ce cas, la pompe péristaltique 20 est alors commandée en tension périodiquement et l'arrêt  
20 de la phase de prélèvement est effectué sur détection par le micro-processeur CPU des messages correspondants de niveau d'échantillon dans le pot d'échantillonnage 3.

Le troisième sous programme 1002 est ensuite suivi d'un quatrième sous programme 1003 permettant d'assurer une phase de  
25 transfert de l'échantillon contenu dans le pot d'échantillonnage 2 vers les circuits analyseurs ou, tout au moins, vers les circuits de distribution CD par l'intermédiaire des électrovannes 35 et 36. Le quatrième sous programme 1003 permet par exemple, suite à l'ouverture des électrovannes 35 et 36, de commander en tension l'électrovanne 37 de façon à envoyer  
30 dans le pot d'échantillonnage 3 à la partie supérieure de celui-ci relativement à l'échantillon contenu dans le pot d'échantillonnage précité une surpression de gaz inerte au liquide biologique constituant l'échantil-



lon. Cette suppression permet d'assurer un transfert de la totalité de l'échantillon vers le collecteur de fractionnement selon une séquence prédéterminée.

5 Le quatrième sous programme 1003 précédemment décrit est alors suivi d'un cinquième sous programme 1004 permettant d'assurer un rinçage à l'eau par commande en tension de la première électrovanne 421, la deuxième électrovanne 422 à l'état non excité délivrant l'eau de rinçage vers le pot d'échantillonnage 3 par l'intermédiaire de la pompe péristaltique 20 commandée elle-même en tension. Le rinçage, bien entendu, peut  
10 être effectué en permanence pendant une durée déterminée.

En outre, suite au cinquième sous programme 1004 précédemment mentionné, succède un sixième sous programme 1005 de lavages successives de durées de quelques secondes par exemple du pot d'échantillonnage 3 et des canalisations par l'intermédiaire de la première  
15 électrovanne à trois voies 421 et de la pompe péristaltique 20.

Enfin, un septième sous programme 1006 de séchage du pot d'échantillonnage est prévu afin d'assurer le séchage du pot d'échantillonnage précité et des canalisations pendant quelques minutes par l'intermédiaire de la commande en tension de la première 421 et deuxième  
20 électrovanne à trois voies 422 et de la pompe péristaltique 20.

Bien entendu, la succession des programmes précités n'est pas limitative, un sous programme pouvant être appelé de manière arbitraire de façon à constituer une séquence appropriée en fonction de l'application considérée. Ainsi, il est possible entre le sous programme de phase de  
25 prélèvement 1002 et le sous programme de phase de transfert échantillon vers les circuits analyseurs 1003 d'insérer un appel du sous programme de phase de décolmatage 1000 pour constituer un nouveau décolmatage de l'élément de filtration I.

Un tableau récapitulatif d'un cycle de prélèvement automatique préférentiel est donné ci-après dans la description, ce tableau  
30 indiquant à titre d'exemple non limitatif, d'une part, les sous programmes appelés, les numéros des séquences correspondantes, les opérations

unitaires correspondant à chaque séquence, la durée de ces opérations et les électrovannes et éléments du système représentés en figure 1 commandés en tension.

5

10

15

20

25

SEQUENCES	OPERATIONS UNITAIRES	DUREES	ORGANES SOUS TENSION
2	Prédécolmatage	0,5 s	423
3	Attente	10 s	
4	Prélèvement	jusqu'à contact sonde niveau choisie	Pompe 20, 22 à raison de 0,2 s toutes les 30 s
5	Décolmatage	0,5 s	423
6	Transfert vers le collecteur		35, 37, 36
7	Rinçage à l'eau	1 mn	20, 35, 421
7'	3 lavages successifs du pot et des canalisations	3s 10s	20, 421 20, 35, 421
8	Séchage pot + canalisations	2 mn	20, 35, 422 421, 22
9	Avance d'un tube		
10	Attente préprogrammée d'un nouveau cycle		

30

Bien entendu, les durées précitées sont données à titre indicatif et sont susceptibles d'être modifiées pour adaptation aux différents types de culture ou milieux biologiques. Par exemple, la durée

de la séquence n° 5 de décolmatage peut être augmentée jusqu'à 3 à 4 secondes si nécessaire et la séquence 6 de transfert peut être de l'ordre de 10 secondes. Celle de la séquence 9 est très rapide et celle de la séquence 10 est quelconque.

5 On notera que dans un mode de réalisation particulièrement avantageux du système objet de l'invention, le microprocesseur CPU peut avantageusement être constitué par un microprocesseur 8 bits normalement disponible dans le commerce. Dans ce cas, le microprocesseur CPU peut être interconnecté par une liaison de type bus vers un microordinateur,  
10 lequel permet d'assurer un fonctionnement interactif du système objet de l'invention avec un utilisateur, le système, objet de l'invention précité, pouvant alors être programmé.

Dans le cas où le microprocesseur CPU est constitué par un microprocesseur 8 bits, il est alors avantageux d'affecter chaque bit du mot  
15 de 8 bits traité par le microprocesseur considéré à l'un des éléments tel que électrovanne à deux voies ou trois voies ou pompe péristaltique du dispositif représenté en figure 1 par l'intermédiaire de l'interface de commande correspondante 51. Ainsi, chaque séquence correspond simplement à un mot de 8 bits constituant le sous programme 1000 à 1006  
20 représenté en figure 5. Chaque bit de valeur 0 ou 1 peut alors permettre, par l'intermédiaire des interfaces de commande 51 précitées, de commander en tension ou, au contraire, de supprimer cette commande en tension pour les électrovannes ou la pompe péristaltique considérée.

Dans un mode de réalisation particulier non limitatif, le  
25 microprocesseur CPU et les circuits d'interface sont remplacés par un automate programmable. L'automate programmable utilisé était un automate programmable de marque KLÖCKNER-MOELLER type PS3-DC. Un tel mode de réalisation permet une utilisation plus souple du système.

On a ainsi décrit un système échantillonneur automatique d'un  
30 liquide biologique à prélèvement stérile particulièrement avantageux.

En effet, le système, objet de l'invention, permet une mise en place "in situ" en l'absence de boucle de recyclage. Ensuite, le système,

objet de l'invention, permet d'assurer un prélèvement d'échantillon en l'absence de contrainte sur les cellules animales, végétales ou microorganismes du milieu biologique dans lequel l'échantillon doit être prélevé, le système, selon l'invention, étant en cela non destructeur.

5           En outre, le système selon l'invention permet d'obtenir un comportement stérile en l'absence de nécessité d'une stérilisation à la vapeur conformément aux dispositifs de l'art antérieur.

          De même, l'utilisation d'un élément de filtration de porosité de 0,2  $\mu$ m ou en deçà en couche externe, simple ou double permet  
10 d'effectuer un échantillonnage de milieu biologique comportant des bactéries.

          En outre, la simplicité de conception du système représenté en figure 1 permet d'obtenir, d'une part, une grande fiabilité de fonctionnement de l'ensemble à très faible volume mort, ce qui permet une filtration  
15 de petit volume avec un court temps de latence.

          Bien entendu, un autre avantage du système, objet de l'invention, est le contrôle permanent du colmatage de l'élément de filtration par une première séquence de prédécolmatage puis une séquence de décolmatage, suite à la séquence de prélèvement.

20           En outre, le système, objet de l'invention, permet le choix d'un volume d'échantillonnage constant quelle que soit la quantité de gaz dissous et désorbant, la concentration en cellules du milieu biologique considéré, la taille de ces cellules ou encore la pression interne dans le réacteur R.

          En outre, les cartouches de l'élément de filtration 1 amovible  
25 sont facilement réutilisables et interchangeables.

          Le système, objet de l'invention, permet également une utilisation modulaire à partir de la taille des petits réacteurs ou fermenteurs de laboratoire de contenance de deux litres jusqu'à la taille industrielle.

30           L'utilisation du système, tel que représenté en figure 1, est facilitée par la mise en surpression du réacteur ou fermenteur R, ce qui permet d'envisager une utilisation avec des milieux ou liquides biologiques relativement visqueux.

Enfin, une analyse de produits volatils précise peut être effectuée grâce à la réfrigération du pot d'échantillonnage ou de molécules peu ou pas volatiles.

Des tests de stérilité et de bon fonctionnement du dispositif ou système selon l'invention, tel que représenté en figure 1, ont été effectués selon deux processus différents :

- par simulation de prélèvement répétitif à intervalles de 2 heures pendant une durée de 2 semaines sur un milieu synthétique classique de fermentation, stérile et sans ensemencement de microorganismes,
- puis par injection de milieu fortement chargé en bactéries de petite taille de l'extérieur du module de filtration vers l'intérieur du fermenteur, c'est-à-dire dans un milieu stérile.

Les résultats obtenus ont été très satisfaisants puisqu'aucune contamination du milieu contenu dans le fermenteur n'a été observée.

Le bon fonctionnement du système a par ailleurs été testé sur la qualité des prélèvements à partir de fermentations utilisant différents microorganismes avec des levures telles Saccharomyces uvarum et Saccharomyces cerevisiae, des bactéries comme Escherichia coli et Clostridium acetonobutylicum et enfin un mélange de bactéries, levures et champignons filamenteux. Quelles que soient les conditions opératoires, l'échantillon prélevé a toujours été exempt de microorganismes. De plus, les suivis en ligne, grâce au couplage chromatographe en phase gazeuse/échantillonneur, de fermentations anaérobies comme la production d'éthanol par S. uvarum ou d'acétone-butanol par C. acetonobutylicum, ont montré une excellente concordance entre les analyses en ligne et celles réalisées par prélèvement manuel hors ligne.

### REVENDEICATIONS

1. Système échantillonneur automatique d'un liquide biologique à prélèvement stérile, ledit système échantillonneur comprenant un module de prélèvement dans un réacteur du liquide biologique, un module  
5 de filtration relié à un pot d'échantillonnage, un circuit de distribution du ou des échantillons vers des moyens analyseurs et des moyens de commande et de calcul interconnectés respectivement au module de prélèvement, au module de filtration, au pot d'échantillonnage et au circuit de distribution  
10 du ou des échantillons pour assurer une commande séquentielle de la prise d'échantillons, caractérisé en ce que ledit module de filtration (1) est placé en extrémité dudit module de prélèvement (2) dans le réacteur (R), ledit pot d'échantillonnage (3) étant directement connecté en sortie du module  
15 de prélèvement (2) et en ce que ledit système échantillonneur comporte, en outre, un circuit (40, 41, 42) d'injection de fluides de contrôle des circuits de prélèvement constitués par le module de filtration (1), le module de  
prélèvement (2), le pot d'échantillonnage (3), ledit circuit d'injection de fluides de contrôle étant commandé séquentiellement par ledit moyen de  
contrôle et de calcul (5).

2. Système selon la revendication 1, caractérisé en ce que  
20 ledit circuit d'injection de fluides de contrôle des circuits de prélèvement comporte un premier circuit (40) d'injection d'un gaz inerte au liquide biologique permettant d'assurer un prédécolmatage et/ou un décolmatage dudit module de filtration (1) par injection dudit gaz vers le réacteur (R).

3. Système selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé  
25 en ce que ledit circuit d'injection de fluides de contrôle des circuits de prélèvement comporte un deuxième circuit (41) d'injection d'une eau de rinçage des circuits assurant la liaison entre ledit réacteur (R) et le pot d'échantillonnage (3).

4. Système selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en  
30 ce que ledit circuit d'injection de fluides de contrôle des circuits de prélèvement comporte, en outre, un troisième circuit (42) d'injection d'air

sec dans les circuits assurant la liaison entre ledit réacteur (R) et le pot d'échantillonnage (3).

5 5. Système selon l'une des revendications 2 à 4 précédentes, caractérisé en ce que lesdits premier (40), deuxième (41), troisième (42) circuits d'injection d'un gaz inerte, d'une eau de rinçage, d'un air sec sont constitués par :

- 10 . une première électrovanne (421) à trois voies interconnectée en liaison entre l'extrémité dudit module de prélèvement relié au module de filtration (1) et ledit pot d'échantillonnage (3), et recevant, sur une entrée auxiliaire, l'eau de rinçage ou l'air de séchage,
- . une deuxième électrovanne à trois voies (422) connectée en liaison entre le circuit d'amenée d'eau de rinçage et ladite entrée auxiliaire de la première électrovanne, et recevant, sur une entrée auxiliaire, ledit air de séchage,
- 15 . une troisième électrovanne à trois voies (423) connectée en liaison entre la première électrovanne et ledit pot d'échantillonnage (3) et dont une entrée auxiliaire reçoit ledit gaz inerte au liquide biologique.

20 6. Système selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite troisième électrovanne est interconnectée audit pot d'échantillonnage par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (20).

7. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit pot d'échantillonnage (3) est un pot réfrigéré.

8. Système selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit pot d'échantillonnage (3) comprend :

- 25 . un orifice (30) d'entrée d'échantillon,
- . une chambre (31) d'admission d'échantillon muni d'un répartiteur (310),
- . un évent (311) en communication avec ladite chambre d'admission (31),
- . une chambre de réception d'échantillon (32) en communication avec ladite chambre d'admission (31), ladite chambre de réception d'échantillon (32) étant munie d'une pluralité d'électrodes (320, 321, 322)
- 30 constituant sondes de niveau de liquide biologique échantillonné.

5 9. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la liaison entre ladite première (421) électrovanne à trois voies et l'extrémité dudit module de prélèvement relié au module de filtration (1) est effectuée par l'intermédiaire d'une vanne multivoies de sélection (21) dont les entrées multiples peuvent être reliées séquentiellement à un réacteur déterminé et dont la sortie est directement connectée à ladite première électrovanne trois voies (421).

10 10. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit module de filtration (1) comporte :

- 15 . un corps de filtre central (10) formant axe de montage d'un élément de filtration,
- . un élément de filtration amovible (11) formé par un manchon en matériau céramique et engagé sur ledit axe de montage (10), la liaison entre les bords de section droite dudit élément de filtration (11) et les surfaces d'appui dudit axe de montage (10) étant effectuée au moyen de joints d'étanchéité (100, 110).

20 11. Système selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit élément de filtration (11) est constitué par :

- . un manchon cylindrique (112) céramique de diamètre moyen de pores de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ ,
- . une couche interne (114) et une couche externe (113) en céramique greffées sur les surfaces latérales interne et externe dudit manchon cylindrique, lesdites couches interne (114) et externe (113) greffées présentant un diamètre moyen de pores inférieur ou égal à 0,2  $\mu\text{m}$ .

25 12. Système selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit axe de montage comporte une canalisation interne centrale (105) aboutissant à la partie opposée à la partie distale dudit axe de montage et constituant l'extrémité desdits moyens de prélèvement (2).

30 13. Système selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdits moyens (5) de commande et de calcul sont constitués par un microprocesseur interconnecté à des circuits d'interface (51, 52) et comportant une mémoire de programme (50).



14. Système selon la revendication 13, caractérisé en ce que lesdits circuits d'interface comportent :

- 5 . une première série (51) de circuits d'interface de commande de prélèvement, lesdits circuits d'interface de la première série consistant chacun en un circuit de conversion numérique analogique délivrant à chacune des électrovannes trois voies et à ladite pompe péristaltique une tension de commande de marche ou d'arrêt,
- 10 . une deuxième série (52) de circuits d'interface de détection de niveau d'échantillon, lesdits circuits d'interface de la deuxième série consistant chacun en un circuit de conversion analogique numérique délivrant audit microprocesseur des messages correspondants de niveau d'échantillon dans le pot d'échantillonnage.

15 15. Système selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce que ledit microprocesseur comporte, implanté en mémoire morte (50) associée audit microprocesseur, un programme de conduite séquentielle du prélèvement d'échantillon, ledit programme comportant au moins :

- 20 . un premier sous programme (1000) permettant d'assurer une phase de prédécolmatage dudit élément de filtration par admission d'un gaz inerte vers le réacteur, ladite troisième électrovanne à trois voies étant commandée en tension et lesdites première et deuxième électrovannes à trois voies étant au repos,
- 25 . un deuxième sous programme (1001) permettant de placer le système en une phase d'attente pendant une durée de quelques secondes, aucun des éléments de prélèvement n'étant excité,
- 30 . un troisième sous programme (1002) permettant d'assurer une phase de prélèvement proprement dit, ladite pompe péristaltique étant commandée en tension périodiquement, l'arrêt de la phase de prélèvement étant effectué sur détection par ledit microprocesseur des messages correspondants de niveau d'échantillon dans le pot d'échantillonnage,
- . un quatrième sous programme (1003) permettant d'assurer une phase de transfert de l'échantillon contenu dans le pot d'échantillonnage vers les circuits analyseurs,

- 5 . un cinquième sous programme (1004) permettant d'assurer un rinçage à l'eau par commande en tension de ladite première électrovanne, ladite deuxième électrovanne, à l'état non excité, délivrant ladite eau de rinçage vers le pot d'échantillonnage, par l'intermédiaire de la pompe péristaltique commandée en tension, ledit rinçage étant effectué pendant une durée prédéterminée,
- 10 . un sixième sous programme (1005) de lavages successifs de durées de quelques secondes du pot d'échantillonnage et des canalisations par l'intermédiaire de la première électrovanne à trois voies et de la pompe péristaltique,
- 15 . un septième sous programme (1006) de séchage du pot d'échantillonnage et des canalisations pendant quelques minutes, par l'intermédiaire de la commande en tension de la première et deuxième électrovanne à trois voies, de la pompe péristaltique.

16. Système selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdits moyens (5) de commande sont constitués par un automate programmable.

1 / 4

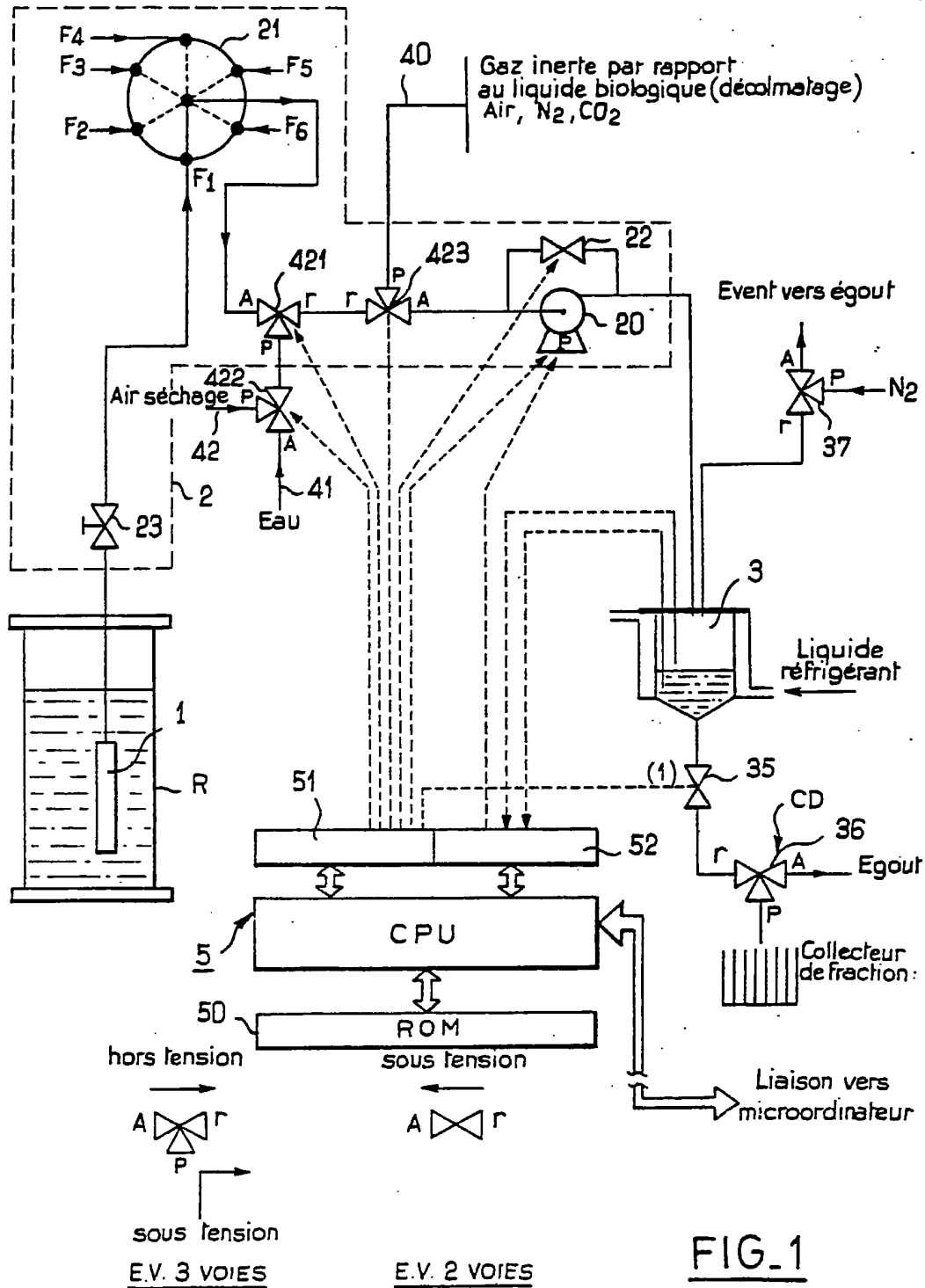


FIG. 1

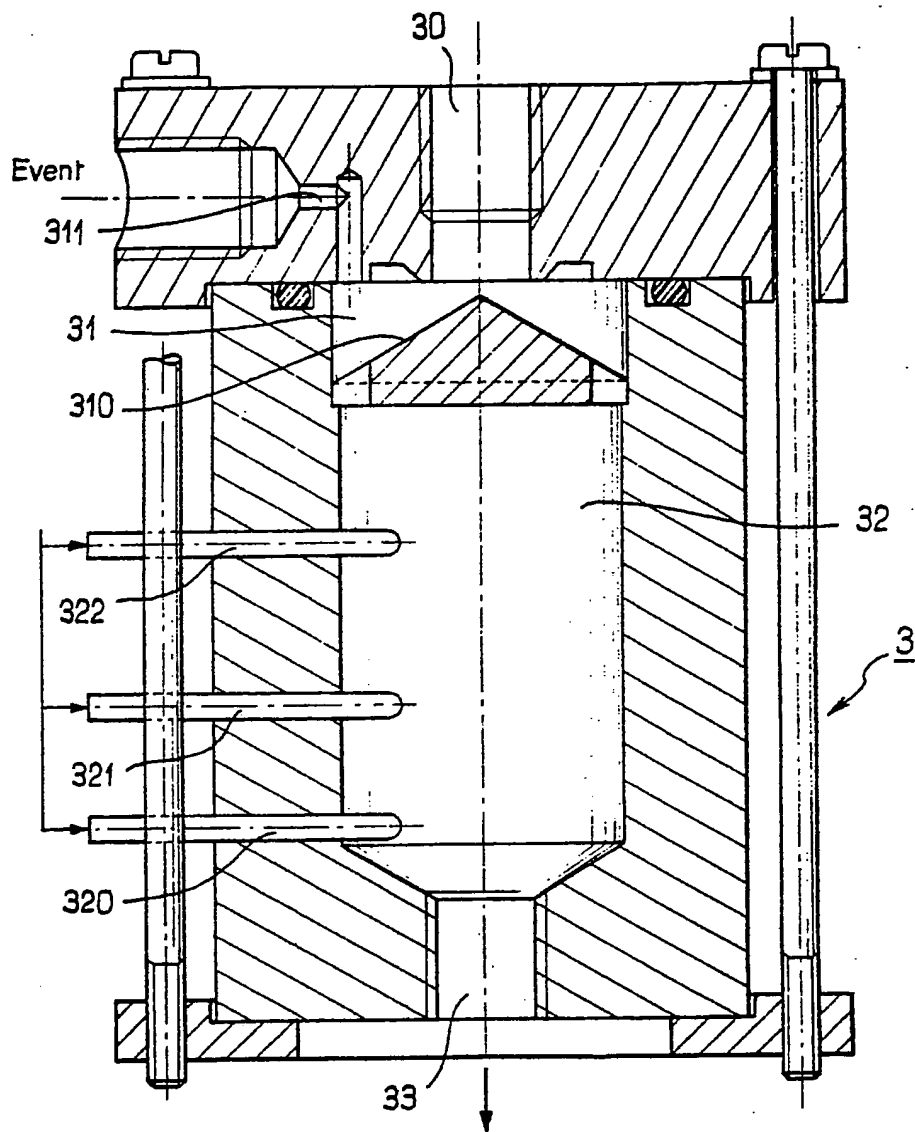
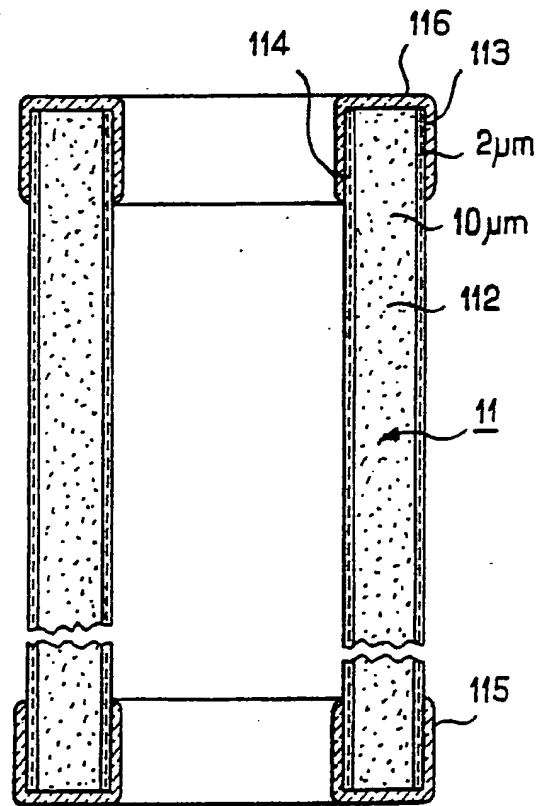
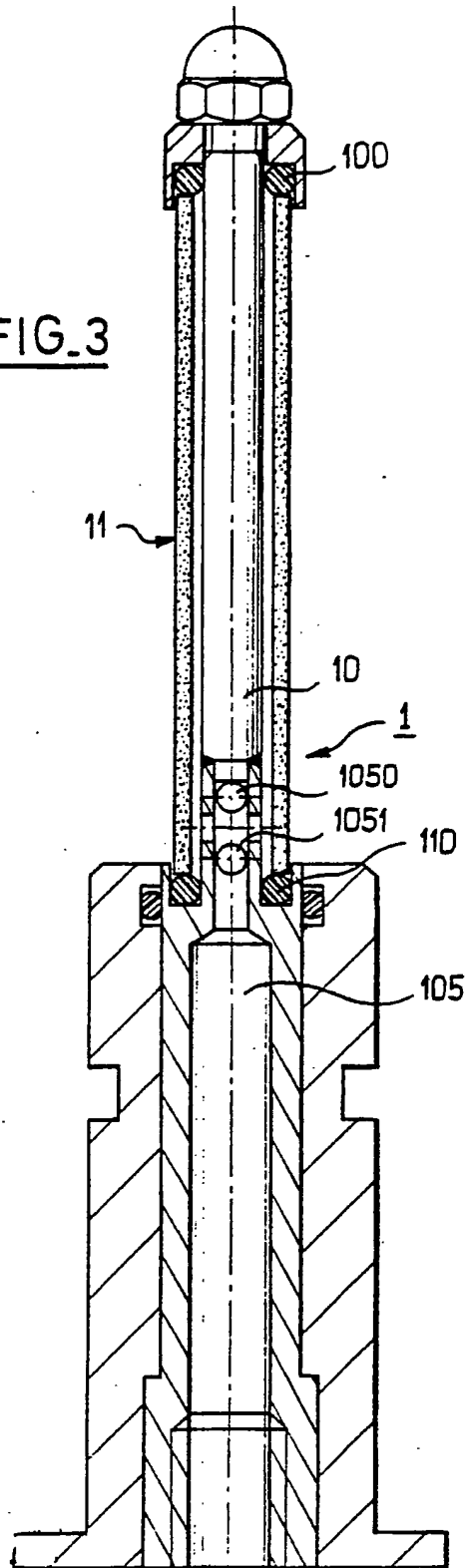
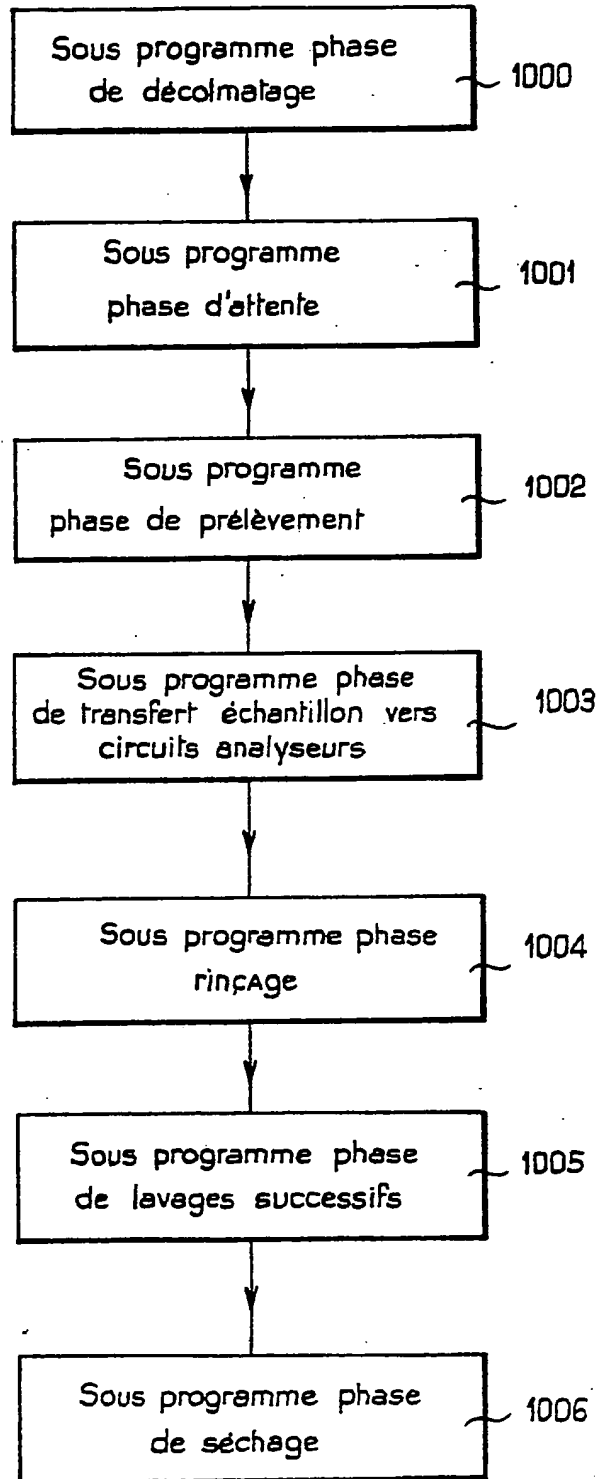


FIG. 2

3/4

FIG. 3FIG. 4

4 / 4

FIG.5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**